

15.06.2004

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2003年 6月11日  
Date of Application:

出願番号 特願2003-166684  
Application Number:  
[ST. 10/C]: [JP2003-166684]

出願人 独立行政法人 科学技術振興機構  
Applicant(s):

REC'D 06 AUG 2004  
WIPO PCT

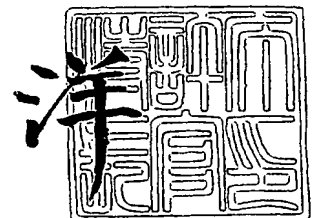
BEST AVAILABLE COPY

PRIORITY  
DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 7月22日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願

【整理番号】 K052P09

【提出日】 平成15年 6月11日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 5/00  
C12N 5/06  
C12N 5/08

【発明者】

【住所又は居所】 岡山県岡山市伊島町 2 - 5 - 2 6 - 1 0 1

【氏名】 小阪 美津子

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

【識別番号】 100080034

【弁理士】

【氏名又は名称】 原 謙三

【電話番号】 06-6351-4384

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 003229

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0111475

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 動物の虹彩色素上皮細胞由来の組織細胞の生産方法、およびその方法により得られる組織細胞

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

動物の眼球から単離した虹彩色素上皮細胞を浮遊凝集塊培養方法により選択的に培養することで得られる幹細胞を、血清を用いて培養する幹細胞培養工程を含むことを特徴とする組織細胞の生産方法。

【請求項 2】

上記動物は、ニワトリ、マウス、ラット、またはヒトのいずれかであることを特徴とする請求項 1 に記載の組織細胞の生産方法。

【請求項 3】

上記血清は、ウシ胎児血清またはトリ血清であることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の組織細胞の生産方法。

【請求項 4】

上記血清の濃度を、5%～15%とすることを特徴とする請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の組織細胞の生産方法。

【請求項 5】

上記幹細胞培養工程において、さらに成長因子を用いることを特徴とする請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の組織細胞の生産方法。

【請求項 6】

上記成長因子は、EGFまたはFGFであることを特徴とする請求項 5 に記載の組織細胞の生産方法。

【請求項 7】

上記幹細胞培養工程において、上記幹細胞を1ヶ月～3ヶ月間培養することを特徴とする請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の組織細胞の生産方法。

【請求項 8】

上記虹彩色素上皮細胞は、動物の眼球から虹彩組織を摘出する虹彩組織摘出工程と、

摘出した上記虹彩組織から虹彩色素上皮を分離する虹彩色素上皮分離工程とにより単離されることを特徴とする請求項 1～7 に記載の組織細胞の生産方法。

【請求項 9】

上記虹彩組織摘出工程は、動物の眼球から虹彩組織のみを切除する虹彩組織切除段階と、

上記切除した虹彩組織を酵素処理する酵素処理段階と、

上記酵素処理した虹彩組織を回復させる虹彩組織回復段階とを含んでいることを特徴とする請求項 8 に記載の組織細胞の生産方法。

【請求項 10】

請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の組織細胞の生産方法により得られる組織細胞。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、動物の虹彩色素上皮細胞由来の組織細胞の生産方法、およびその方法により得られる組織細胞に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

近年、脳、脊髄由来の神経幹細胞や、ES 細胞（胚性幹細胞）の多分化機能を利用して細胞をつくり、これを移植するという再生医療が注目されている。

【0003】

上記神経幹細胞や ES 細胞の医療への応用を考えた場合には、細胞移植による免疫拒絶の問題、倫理的問題、移植細胞源の需要と供給のアンバランスなどの多くの問題が生じる。

【0004】

そこで、移植対象となる個体自身に由来する細胞を移植源として用いることが可能となれば、自家移植が可能となり上記の問題を解決することができる。

【0005】

上記移植源としての利用が期待されている細胞として、眼球の虹彩色素上皮細胞

胞がある。

【0006】

虹彩色素上皮細胞は、光量に応じて瞳孔を開いたり、狭めたりして網膜に届く光量を調節するための組織である虹彩を構築している細胞のひとつである。

【0007】

本発明者は、これまでにニワトリの雛の虹彩色素上皮細胞を単離培養することに成功したことを、非特許文献1で報告している。

【0008】

さらに、本発明者は、上記非特許文献1の方法に改変を加えることにより、哺乳動物（マウス、ラット、ヒト胎児）の虹彩細胞の単離培養を可能とした（非特許文献2を参照）。

【0009】

虹彩色素上皮細胞は、患者本人からその細胞の一部を採取することが可能であるので、もし、虹彩色素上皮細胞を用いた組織細胞の生産が可能となれば、患者自身の細胞を用いた再生医療が実現することになる。（なお、本発明者が調査した限りでは、本発明にかかる、動物の虹彩色素上皮細胞由来の幹細胞から組織細胞を生産する方法、およびこの方法により得られる組織細胞に関する従来技術文献は見出されなかった。）

【0010】

【非特許文献1】

Experimental Cell Res. (1998) 245, 245-251

【0011】

【非特許文献2】

nature neuroscience (2001) 4 (12), 1163

【0012】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、動物の虹彩色素上皮細胞から神経系以外の組織細胞を生産する方法は確立されていない。

【0013】

本発明は、上記従来の問題点に鑑みてなされたものであって、その目的は、細胞移植による免疫拒絶の問題、倫理的問題、移植細胞源の需要と供給のアンバランスなどの問題を解決し得る、動物の虹彩色素上皮細胞由来の組織細胞の生産方法、およびその方法により得られる組織細胞を提供することにある。

#### 【0014】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者は、上記課題について鋭意検討した結果、動物の眼球から単離した虹彩色素上皮細胞を浮遊凝集塊培養方法により選択的に培養して得た幹細胞を特定の培養条件で維持すると凝集塊が得られること、また該凝集塊は胚様体 (embryoid body) 構造を形成しており、その中には、例えば筋肉細胞や血管内皮様細胞などの様々な組織細胞が含まれることを見出し、本発明を完成させるに至った。

#### 【0015】

本発明の組織細胞の生産方法は、上記課題を解決するために、動物の眼球から単離した虹彩色素上皮細胞を浮遊凝集塊培養方法により選択的に培養することで得られる幹細胞を、血清を用いて培養する幹細胞培養工程を含むことを特徴としている。

#### 【0016】

上記の構成によれば、従来公知の動物成体の虹彩色素上皮の単離方法により、動物の眼球から虹彩組織を摘出し、虹彩組織から虹彩色素上皮を単離し、単離した虹彩色素上皮を、浮遊凝集塊培養方法により選択的に培養することにより幹細胞を得ることができる。

#### 【0017】

そして、血清を用いて上記幹細胞を培養することにより、胚様体 (embryoid body) 構造を形成することができる。

#### 【0018】

上記胚様体は、主にES細胞から分化誘導されて生じる胚のような組織を含む構造体である。この胚様体は、三胚葉性細胞を含んでいることから、虹彩由来幹細胞がES細胞に似た全能性を保持すると考えられる。そこで、この虹彩上皮細胞由来の胚様体構造に含まれる細胞を、本発明では動物の虹彩色素上皮細胞由来

の組織細胞と称する。

【0019】

本発明では、上記動物は、例えば、ニワトリ、マウス、ラット、またはヒトのいずれかである。上記血清は、例えば、ウシ胎児血清またはトリ血清である。また、上記血清の濃度は、5%～15%とすることが好ましい。

【0020】

また、上記幹細胞培養工程において、さらに成長因子を用いてもよい。上記成長因子としては、例えば、EGF (epidermal growth factor: 上皮成長因子)、FGF (fibroblast growth factor: 繊維芽細胞成長因子) 等を用いることができる。また、上記幹細胞培養工程において、上記幹細胞を1ヶ月～3ヶ月間培養することが好ましい。

【0021】

本発明にかかる上記組織細胞は、患者本人からその細胞の一部を採取することが可能な虹彩色素上皮細胞に由来している。したがって、本発明によれば、動物の虹彩色素上皮細胞から、再生医療で移植源として活用できる組織細胞を生産することができる。

【0022】

また、本発明の組織細胞の生産方法では、上記虹彩色素上皮細胞は、動物の眼球から虹彩組織を摘出する虹彩組織摘出工程と、摘出した上記虹彩組織から虹彩色素上皮を分離する虹彩色素上皮分離工程とにより単離されることを特徴としている。

【0023】

これによれば、動物の虹彩色素上皮細胞を効率よく分離することで、本発明の組織細胞を効率よく生産することができる。

【0024】

また、本発明では、上記虹彩組織摘出工程は、動物の眼球から虹彩組織のみを切除する虹彩組織切除段階と、上記切除した虹彩組織を酵素処理する酵素処理段階と、上記酵素処理した虹彩組織を回復させる虹彩組織回復段階とを含んでいることを特徴としている。

## 【0025】

これによれば、動物の眼球から虹彩組織のみを効率よく摘出することで、本発明の組織細胞をより効率よく生産することができる。

## 【0026】

本発明にかかる組織細胞は、本発明の組織細胞の生産方法を用いて得られるものであり、上述したように、動物の虹彩色素上皮細胞に由来したものである。したがって、本発明の組織細胞を、細胞移植による免疫拒絶の問題、倫理的問題、移植源細胞の需要と供給のアンバランスなどの問題を解決し得る移植細胞源として提供することができる。

## 【0027】

## 【発明の実施の形態】

## 〔実施の形態1〕

本発明の実施の一形態について図1に基づいて説明すれば、以下の通りである。なお、本発明はこれに限定されるものではない。

## 【0028】

本発明者は、再生医療における細胞移植による免疫拒絶の問題、倫理的問題、移植細胞源の需要と供給のアンバランスなどの問題を解決する目的で、動物の虹彩色素上皮細胞由来の組織細胞を生産した。

## 【0029】

本実施の形態にかかる組織細胞の生産方法は、動物の眼球から単離した虹彩色素上皮細胞を浮遊凝集塊培養方法により選択的に培養することで得られる幹細胞を、血清を用いて培養する幹細胞培養工程を含む構成である。

## 【0030】

すなわち、本実施形態の組織細胞の生産方法は、図1に示すように、少なくとも、動物の眼球から虹彩色素上皮細胞を単離する虹彩色素上皮細胞単離工程（ステップ1、以下ステップをSと略す）と、単離した虹彩色素上皮細胞を浮遊凝集塊培養方法により選択的に培養することで幹細胞を得る幹細胞生産工程（S2）と、上記幹細胞を血清を用いて培養する幹細胞培養工程（S3）とを含んでいる。なお、本発明にかかる組織細胞の生産方法はこれに限定されるものではなく、



他の工程が含まれていてもよい。

上記動物は、幼若個体から成体に至るまでのどの時期の個体であってもよい。すなわち、本実施の形態にかかる組織細胞の生産方法は、動物幼若個体虹彩色素上皮細胞由来の組織細胞を生産することが可能なことは言うまでもないが、動物成体の虹彩色素上皮細胞由来の組織細胞を生産することが可能である。

#### 【0031】

S1の虹彩色素上皮細胞単離工程は、虹彩色素上皮細胞を単離できればよく、その具体的な手法等については特に限定されるものではない。一般的には、従来公知の手法を利用して、動物の眼球から虹彩組織を摘出し、摘出した虹彩組織から虹彩色素上皮細胞を単離すればよい。動物の眼球から虹彩組織を摘出する方法としては、nature neuroscience (2001) 4 (12), 1163 (前記非特許文献2)に記載の方法を用いることが好ましい。

#### 【0032】

S2の幹細胞生産工程は、動物の眼球から単離した虹彩色素上皮細胞のみを選択的に培養できればよく、その具体的な手法等については特に限定されるものではない。一般的には、従来公知の手法を利用して、動物の眼球から単離した虹彩色素上皮細胞のみを選択的に培養すればよい。

#### 【0033】

ここで、幹細胞生産工程 (S2) には、プロセス6 (以下、プロセスをPと略す) として、虹彩色素上皮細胞単離工程 (S1) において単離された虹彩色素上皮細胞を、凝集している状態から個々の細胞に解離するための細胞解離段階と、P7として、単離した虹彩色素上皮細胞のみを選択的に培養する細胞培養段階とが含まれる。

#### 【0034】

以下、幹細胞生産工程 (S2) の各段階P6およびP7について詳細に説明する。まず、P6の細胞解離段階では、単離された虹彩色素上皮のシート状の細胞を個々の細胞に解離する。

#### 【0035】

例えば、P 6 の細胞解離段階は、市販のトリプシン溶液を用いて、単離された虹彩色素上皮のシート状の細胞を個々の細胞に解離する。また、例えば、P 6 の細胞解離段階は、トリプシン溶液を用いずに、市販のマイクロピペットを用いたピペッティング操作により、単離された虹彩色素上皮のシート状の細胞を個々の細胞に解離することもできる。

#### 【0036】

なお、P 6 の細胞解離段階に用いられる試薬および器具は、特に限定されるものではなく、単離された虹彩色素上皮細胞を凝集している状態から個々の細胞に解離することが可能な従来公知の試薬および器具を用いることができる。

#### 【0037】

P 7 の細胞培養段階では、単離した虹彩色素上皮細胞を浮遊状態でFGF (fibroblast growth factor: 繊維芽細胞成長因子)、LIF (leukemia inhibitory factor: 白血病阻害因子)、あるいはSCF (human SCF (Stem Cell Factor: ヒト幹細胞因子) の単独、または組み合わせによる因子添加の無血清培地で培養する。これにより、上記虹彩色素上皮細胞を未分化状態で増やすことが可能となるので、その結果得られる組織細胞も多くなる。この段階では、Science 1992: 225; 1707-1710に記載の浮遊凝集塊培養法 (neurosphere法) を用いて、動物の眼球から単離した虹彩色素上皮細胞を選択的に培養することが好ましい。

#### 【0038】

例えば、P 7 の細胞培養段階では、市販の無血清培地に市販のN2サプリメントを加えたものを浮遊凝集塊培養用の培養液として使用する。P 6 の細胞解離段階にて解離された上記虹彩色素上皮細胞を、上記浮遊凝集塊培養用の培養液中にて、市販のシェーカーを用いて回転を加えながら培養する。これによって幹細胞を得ることができる。

#### 【0039】

なお、P 7 の細胞培養段階に用いられる培養液および試薬は、特に限定されるものではなく、上記幹細胞を得ることが可能な従来公知の培養液および試薬を用いることができる。

#### 【0040】

また、本実施の形態では、P 7 の細胞培養段階における培養期間は、必要に応じて適宜設定すればよいものとする。ただし、このとき培養を長く続けすぎると、得られる凝集塊が大きくなりすぎて分化してしまう虞がある。そこで、本実施の形態では、3～4 日以内に細胞を解離して巻き込む（継代）することが望ましい。

#### 【0041】

そして、S 3 の幹細胞培養工程で、血清を用いて P 7 の細胞培養段階で得られた幹細胞を培養する。S 3 の幹細胞培養工程では、血清を用いて上記幹細胞を培養できればよく、その具体的な手法等については特に限定されるものではない。一般的には、従来公知の手法を利用して、上記幹細胞を培養すればよい。したがって、例えば、市販のマイクロピペットを用いて、上記幹細胞を血清を含む培地に移し替えて培養することができる。

#### 【0042】

上記血清としては、例えば、ウシ胎児血清およびトリ血清等が挙げられるが、これらは特に限定されるものではない。また、本実施の形態では、これら血清を 1 種類用いてもよく、必要に応じて 2 種類以上用いてもよい。

#### 【0043】

また上記血清の濃度は、特に限定されるものではなく、例えば、5～15%とすることができるが、それ以上の濃度であっても、本発明は実施可能である。

#### 【0044】

本実施の形態では、上記血清に加えて、さらに成長因子を用いて上記幹細胞を培養してもよい。上記成長因子としては、具体的には、例えば、EGF (epidermal growth factor: 上皮成長因子)、FGF (fibroblast growth factor: 繊維芽細胞成長因子) 等が挙げられる。本実施の形態では、これら成長因子を 1 種類用いてもよく、必要に応じて 2 種類以上用いてもよい。

#### 【0045】

また上記成長因子の濃度は、特に限定されるものではなく、必要に応じて適宜設定すればよいものとする。

#### 【0046】

また、本実施の形態では、特に限定されるものではないが、S3の幹細胞培養工程において、上記幹細胞の培養期間を1～3ヶ月とすることが好ましい。上記S3の幹細胞培養工程において、培養期間が2週間以下だと分化誘導効率が下がるため好ましくなく、逆に3ヶ月以上では凝集塊の内部の細胞生存が悪くなる可能性があるので好ましくない。

#### 【0047】

本実施の形態では、上記S3の幹細胞培養工程を行うことで胚様体を得る。この胚様体は、動物の虹彩色素上皮細胞由来であり、この虹彩色素上皮細胞は外胚葉性の細胞である。したがって、本実施の形態で得られる上記胚様体には神経幹細胞が含まれるが、それ以外に、例えば筋肉細胞や血管内皮様細胞等、様々な組織細胞が上記胚様体には含まれている。このように、本実施の形態によれば、S3の幹細胞培養工程により、動物の虹彩色素上皮細胞由来の組織細胞を得ることができる。

#### 【0048】

本実施の形態にかかる組織細胞の生産方法は、上記虹彩色素上皮細胞が、動物の眼球から虹彩組織を摘出する虹彩組織摘出工程と、摘出した上記虹彩組織から虹彩組織上皮を分離する虹彩色素上皮分離工程とにより単離される方法である。なお、本発明にかかる組織細胞の生産方法はこれに限定されるものではなく、他の工程が含まれていてもよい。

#### 【0049】

すなわち、本実施の形態の組織細胞の生産方法は、図1に示すように、少なくとも虹彩色素上皮細胞単離工程（S1）幹細胞生産工程（S2）、および幹細胞培養工程（S3）とが含まれ、さらに、上記虹彩色素上皮細胞単離工程（S1）には、後述する虹彩組織摘出工程（P1）および虹彩色素上皮分離工程（P2）が含まれる。なお、本発明にかかる組織細胞の生産方法はこれに限定されるものではなく、他の工程が含まれていてもよい。

#### 【0050】

上記虹彩組織摘出工程（P1）は、動物の眼球から虹彩組織を摘出できれば良く、その具体的な手法等については特に限定されるものではない。一般的には、

従来公知の手法を利用して、動物の眼球から虹彩組織を摘出すればよい。好ましくは、nature neuroscience (2001) 4 (12), 1163 (前記非特許文献 2) に記載の方法を利用して、動物の眼球から虹彩組織を摘出すればよい。

#### 【0051】

ここで、上記虹彩組織摘出工程 (P 1) は、図 1 に示すように、P 3 として、動物の眼球から虹彩組織のみを切除する虹彩組織切除段階を、P 4 として、切除した虹彩組織を酵素処理する酵素処理段階を、P 5 として、酵素処理した虹彩組織を回復させる虹彩組織回復処理段階を含んでいる。なお、本発明にかかる組織細胞の生産方法はこれに限定されるものではなく、他の工程が含まれていてもよい。

#### 【0052】

以下、虹彩組織摘出工程 (P 1) の各段階 P 3 ~ P 5 について詳細に説明する。まず、P 3 の虹彩組織切除段階は、動物の眼球から虹彩組織のみを切除できればよく、その具体的な手法等については特に限定されるものではない。一般的には、従来公知の手法を利用して、動物の眼球から虹彩組織のみを切除すればよい。

#### 【0053】

例えば、P 3 の虹彩組織切除段階は、市販のマイクロ鋏を用いて動物の眼球から虹彩組織のみを切除する。

#### 【0054】

P 4 の酵素処理段階は、虹彩組織から虹彩色素上皮を分離しやすくするために虹彩組織を酵素処理するものであり、その具体的な手法等については特に限定されるものではない。一般的には、従来公知の手法を利用して、虹彩組織から虹彩色素上皮を分離しやすくするために虹彩組織を酵素処理すればよい。

#### 【0055】

例えば、ニワトリの眼球から虹彩色素上皮を分離する場合は、P 4 の酵素処理段階で、虹彩組織を市販のディスパーゼを含むディスパーゼ溶液中にて 15 ~ 40 分間反応させた後、市販の EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid: エチレンジアミン四酢酸) を含む EDTA 溶液中にて 20 ~ 30 分間反応させる。なお、P

4の酵素処理段階に用いられる酵素および試薬は、特に限定されるものではなく、虹彩組織から虹彩色素上皮を分離しやすくするように虹彩組織を処理することが可能な従来公知の酵素および試薬を用いることができる。

#### 【0056】

P5の虹彩組織回復処理段階は、酵素処理によって衰弱した虹彩組織を回復させるものであり、その具体的な手法等については特に限定されるものではない。一般的には、従来公知の手法を利用して、酵素処理によって衰弱した虹彩組織を回復すればよい。

#### 【0057】

例えば、P5の虹彩組織回復段階は、P4の酵素処理段階の反応後、虹彩組織を市販のウシ胎児血清を含む培養液中にて、30～60分間反応させて虹彩組織を回復させる。なお、P5の虹彩組織回復処理段階に用いられる血清を含む培養液および試薬は、特に限定されるものではなく、衰弱した虹彩組織が回復することが可能な従来公知の血清を含む培養液を用いることができる。

#### 【0058】

また、虹彩組織摘出工程(P1)においては、P4の酵素処理段階およびP5の虹彩組織回復処理段階の反応時間が特に重要である。P4の酵素処理段階の上記虹彩組織のディスパーゼ溶液による反応時間、および上記EDTA溶液による反応時間、並びにP5の虹彩組織回復処理段階の上記ウシ胎児血清を含む培養液による反応時間を調節することによって、ニワトリだけではなく、マウス、ラット、ヒトの眼球から虹彩色素上皮を分離することができる。

#### 【0059】

マウスの眼球から虹彩色素上皮を分離する場合は、上記虹彩組織を25～37℃の上記1000U/mLのディスパーゼ溶液により15～40分間反応させ、室温下にて上記0.05～0.1%EDTA溶液により16～40分間反応させ、ウシ胎児血清を8～10%含む培養液により30～120分間反応させることが好ましい。

#### 【0060】

また、生後10日のマウス眼球から虹彩色素上皮を分離する場合は、上記虹彩

組織を 37℃ の上記 1000 U/mL のディスパーゼ溶液により 16 分間反応させ、室温下にて上記 0.05 % EDTA 溶液により 20 分間反応させ、ウシ胎児血清を 8 % 含む培養液により 90 分間反応させることが特に好ましい。

#### 【0061】

また、生後 12 日のマウスの眼球から虹彩色素上皮を分離する場合は、上記虹彩組織を 37℃ の上記 1000 U/mL のディスパーゼ溶液により 20 分間反応させ、室温下にて上記 0.05 % EDTA 溶液により 25 分間反応させ、ウシ胎児血清を 8 % 含む培養液により 60 分間反応させることが特に好ましい。

#### 【0062】

また、生後 2 ヶ月のマウスの眼球から虹彩色素上皮を分離する場合は、上記虹彩組織を 37℃ の上記 1000 U/mL のディスパーゼ溶液により 30 分間反応させ、室温下にて上記 0.05 % EDTA 溶液により 40 分間反応させ、ウシ胎児血清を 8 % 含む培養液により 30 分間反応させることが特に好ましい。

#### 【0063】

ラットの眼球から虹彩色素上皮を単離する場合は、上記虹彩組織を 37℃ の上記 1000 U/mL のディスパーゼ溶液により 15～40 分間反応させ、室温下にて上記 0.05 EDTA 溶液により 15～60 分間反応させ、ウシ胎児血清を 8～10 % 含む培養液により 30～120 分間反応させることが好ましい。

#### 【0064】

ヒト胎児の眼球から虹彩色素上皮を分離する場合は、上記虹彩組織を 25～37℃ の上記 500～1000 U/mL のディスパーゼ溶液により 15～30 分間反応させ、室温下にて上記 0.05～0.1 % EDTA 溶液により 15～40 分間反応させ、ウシ胎児血清を 8～10 % 含む培養液により 10～60 分間反応させることが好ましい。

#### 【0065】

また、生後 19 週のヒト胎児の眼球から虹彩色素上皮を分離する場合は、上記虹彩組織を 37℃ の上記 1000 U/mL のディスパーゼ溶液により 30 分間反応させ、室温下にて上記 0.05 % EDTA 溶液により 30 分間反応させ、ウシ胎児血清を 8 % 含む培養液により 60 分間反応させることが特に好ましい。

## 【0066】

なお、上記培養液としては、例えば、DMEM培地（invitrogen社製）を用いて、市販のウシ胎児血清を適量添加したものをを用いればよい。

## 【0067】

P2の虹彩色素上皮分離工程は、虹彩組織摘出工程（P1）にて摘出した虹彩基質と虹彩色素上皮とから構築される虹彩組織から、虹彩色素上皮のみを分離できればよく、その具体的な手法等については特に限定されるものではない。一般的には、従来公知の手法を利用して、虹彩組織から虹彩色素上皮のみを分離すればよい。

## 【0068】

例えば、P2の虹彩色素上皮分離工程は、回復させた上記虹彩組織から、市販のマイクロピンセットを用いて、虹彩色素上皮のみをはがして回収することにより、虹彩基質と虹彩色素上皮とを分離する。

## 【0069】

このように、本実施の形態によれば、上記虹彩色素上皮細胞を、P1の虹彩組織摘出工程と、P2の虹彩色素上皮分離工程により単離することで、上記虹彩色素上皮細胞を効率よく分離することができ、これにより上記組織細胞を効率よく生産することができる。

## 【0070】

以上のように、本実施の形態にかかる組織細胞は、患者本人からその細胞の一部を採取することが可能な虹彩色素上皮細胞に由来している。したがって、本実施の形態によれば、本人の虹彩色素上皮細胞から、再生医療において移植源として活用される組織細胞を生産することができる。また、本実施の形態の組織細胞を移植細胞源として用いれば、細胞移植による免疫拒絶の問題、倫理的問題、移植細胞の需要と供給のアンバランスなどの問題を解決することができる。

## 【0071】

## 【実施例】

以下、実施例および図2～図6に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。



## 【0072】

## 〔実施例1〕

## (虹彩色素上皮細胞の単離)

市販のマイクロ鋏を用いて、ニワトリ雛の眼球から虹彩組織のみを切除した。この虹彩組織を37℃のディスパーゼ溶液(「ディスパーゼ(dispase)」合同清酒社製)1000U/mL中にて、15～40分間反応させた後、室温下で0.05%EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid:エチレンジアミン四酢酸)溶液中にて20～30分間反応させた。

## 【0073】

反応後、上記虹彩組織をウシ胎児血清を8%含む培養液(「DMEM培地」invitrogen社製)中にて、30～60分間反応させ、上記虹彩組織を回復させた。その後、市販のマイクロピンセットを用いて、虹彩色素上皮のみを上記虹彩組織からはがして回収することにより、虹彩基質と虹彩色素上皮とを分離した。

## 【0074】

## (浮遊凝集塊培養法)

上記分離した虹彩色素上皮は、市販のトリプシン溶液を用いて細胞に解離した。その後、この解離した虹彩色素上皮細胞を、Science 1992: 225; 1707-1710に記載の浮遊凝集塊培養法(neurosphere法)によって、選択的に培養した。

## 【0075】

浮遊凝集塊培養の培地には、無血清培地(「DMEM/F12培地」invitrogen社製)に、N2サプリメント(invitrogen社製)を100分の1量、FGF2(fibroblast growth factor-2:繊維芽細胞成長因子-2, PeproTech社製)を20ng/mL単独、あるいは、LIF(leukemia inhibitory factor:白血病阻害因子, ESGRO, Chemicon社製)を1000U/mL、およびSCF(human SCF(Stem Cell Factor:ヒト幹細胞因子), DIACLONE社製)を10ng/mLになるように加えた。

## 【0076】

トリプシン処理した上記虹彩色素上皮細胞を、上記の浮遊凝集塊培地にて、市販のシェーカーを用いて回転を与えながら炭酸ガス培養機中で3～7日間培養をすることで幹細胞を得た。得られた幹細胞の様子を図2(a)に示す。

## 【0077】

(幹細胞培養による凝集塊の形成)

上記ニワトリ雛の眼球より単離した虹彩色素上皮細胞を上記浮遊凝集塊培養後、幹細胞培養を以下のように行った。

## 【0078】

上記浮遊凝集塊培養法により得られた上記ニワトリ雛の虹彩色素上皮細胞由来の幹細胞を、市販のマイクロピペットを用いて、以下の (b) および (c) に示す組成の培地に移動した。

(b) ウシ胎児血清 (8%) およびニワトリ血清 (2%) を含むDMEM培地 (invitrogen社製)。

(c) ウシ胎児血清 (8%)、および成長因子としてのEGFおよびFGF2 (各々 20 ng/mL) を含むDMEM培地 (invitrogen社製)。

## 【0079】

そして、上記 (b) および (c) それぞれの培地を用いて上記幹細胞を1～2ヶ月間培養した。その結果、図2 (b), (c) にそれぞれ示すような凝集塊を得た。

## 【0080】

上記 (b), (c) それぞれの培地にて培養することで得られた凝集塊を、デスミン (筋肉細胞マーカー) 抗体、およびDAPI染色 (核) にて標識を行った。その結果を図3に示す。図3 (a) は、図2 (b) の培地で培養することで得られた凝集塊を示し、図3 (b) は、図2 (c) の培地で培養することで得られた凝集塊を示している。図3において、白色の部分がデスミンで標識された凝集塊の像を示しており、灰色で示す部分がDAPI染色 (核) で標識された凝集塊の像を示している。

## 【0081】

## 〔実施例2〕

実施例1と同様にして解離した虹彩色素上皮細胞を、無血清培地 (「DMEM/F12培地」invitrogen社製)、N2サプリメント (invitrogen社製) 100分の1量およびFGF2 (fibroblast growth factor-2: 繊維芽細胞成長因子-2, PeproTech社

製) 20 ng/mL で 3 日間培養した後、下記 (1) ~ (3) の組成を含む 3 種類の培地中で、浮遊凝集塊培養法による培養を 1 ~ 2 ヶ月間行った。

(1) ウシ胎児血清 (8%)、EGF (20 ng/mL)、および FGF2 (20 ng/mL)。

(2) ウシ胎児血清 (8%) および ニワトリ血清 (2%)。

(3) ウシ胎児血清 (8%)、ニワトリ血清 (2%)、EGF (20 ng/mL)、および FGF2 (20 ng/mL)。

#### 【0082】

そして得られた凝集塊から RNA を抽出し、RT-PCR 法を用いてミオシン、 $\alpha$  フェトプロテイン、MEF2、pax6 についての遺伝子発現の有無を調べた。その結果、上記 (1) ~ (3) のどの条件下でも、遺伝子発現が認められた。このことから、得られた凝集塊には、中胚葉、内胚葉、外胚葉由来の細胞が含まれていることがわかる。

#### 【0083】

この結果より、上記凝集塊は、主に ES 細胞から分化誘導されて生じる胚のような組織を含む構造体である胚様体であることがわかった。虹彩色素上皮細胞は外胚葉性の細胞だが、本実施例により、動物の虹彩色素上皮細胞由来の幹細胞から、胚葉性を越えた分化を起こすことができることが示された。

#### 【0084】

##### 〔実施例 3〕

Oct-3/4 は、全能性未分化細胞に特異的に発現する分子であり、その発現が確認される細胞は極めて限定される (図 4 に示す「マウス初期発生過程における Oct-3/4 発現様式」を参考)。生後においては、生殖幹細胞である、精原細胞でのみ発現すると知られており、他の体細胞組織には発現はないとされてきた。

#### 【0085】

本実施例では、出生後のマウスおよびラットの虹彩組織およびそれから得た幹細胞の一部における Oct-3/4 の発現を調べた。その結果を図 5 および図 6 に示す。なお、図 5 は、本発明による方法を用いて出生後 11 日および 3 週間目

のラットそれぞれから得た幹細胞を、Oct-3/4 抗体による染色およびDAPI染色にて標識を行った結果を示しており、白色が標識された部分を示している。また、図6は、マウス眼球におけるOct-3/4 遺伝子発現を示している。図5および図6の結果から、出生後のマウスおよびラットの虹彩組織およびそこから得た幹細胞の一部において、Oct-3/4 遺伝子の発現、および、遺伝子産物（Oct-3/4 タンパク質）の発現があることがわかる。

#### 【0086】

この結果は、虹彩という体細胞組織中にも、未分化全能性を維持する細胞が含まれている可能性を強く示唆するものであり、これらの細胞を純化、培養し、適する条件で分化誘導できれば、様々な組織細胞を生産することが可能となる。ES細胞を応用した再生医療の研究は盛んに行われているが、倫理的問題が大きい。虹彩組織であれば、患者本人の細胞を用いることが可能であるので、自家移植による再生医療を実現することにつながると期待される。

#### 【0087】

##### 【発明の効果】

本発明の組織細胞の生産方法は、以上のように、動物の眼球から単離した虹彩色素上皮細胞を浮遊凝集塊培養方法により選択的に培養することで得られる幹細胞を、血清を用いて培養する幹細胞培養工程を含む構成である。

#### 【0088】

これによれば、動物の虹彩色素上皮細胞から、再生医療で移植源として活用可能な組織細胞を生産することができるという効果を奏する。

#### 【0089】

また、上記動物は、例えば、ニワトリ、マウス、ラット、またはヒトのいずれかである。また、上記血清は、例えば、ウシ胎児血清、トリ血清である。また、上記血清の濃度は、5%～15%とすることが好ましい。また本発明では、上記幹細胞培養工程において、幹細胞を1ヶ月～3ヶ月間培養することが好ましい。これにより、本発明にかかる組織細胞を効率よく生産することができるという効果を奏する。

#### 【0090】

また本発明の組織細胞の生産方法は、以上のように、上記虹彩色素上皮細胞は、動物の眼球から虹彩組織を摘出する虹彩組織摘出工程と、摘出した上記虹彩組織から虹彩色素上皮を分離する虹彩色素上皮分離工程とにより単離される構成である。

#### 【0091】

これによれば、動物の虹彩色素上皮細胞を効率よく分離することで、本発明の組織細胞を効率よく生産することができるという効果を奏する。

#### 【0092】

また、本発明では、上記虹彩組織摘出工程は、動物の眼球から虹彩組織のみを切除する虹彩組織切除段階と、上記切除した虹彩組織を酵素処理する酵素処理段階と、上記酵素処理した虹彩組織を回復させる虹彩組織回復段階とを含んでいる構成である。

#### 【0093】

これによれば、動物の眼球から虹彩組織のみを効率よく摘出することで、本発明の組織細胞をより効率よく生産することができるという効果を奏する。

#### 【0094】

また本発明の組織細胞は、上記組織細胞の生産方法により得られるものである。

#### 【0095】

これにより、本発明の組織細胞を、細胞移植による免疫拒絶の問題、倫理的問題、移植源細胞の需要と供給のアンバランスなどの問題を解決し得る移植源として提供することができるという効果を奏する。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】

本発明にかかる組織細胞の生産方法の一例を示す概略工程図である。

##### 【図2】

実施例1にかかる幹細胞の様子を示す図である。

##### 【図3】

実施例1において、デスミン（筋肉細胞マーカー）抗体、およびDAPI染色

(核) にて標識を行った凝集塊を示す図である。

【図 4】

マウス初期発生過程における Oct-3/4 発現様式を説明する図である。

【図 5】

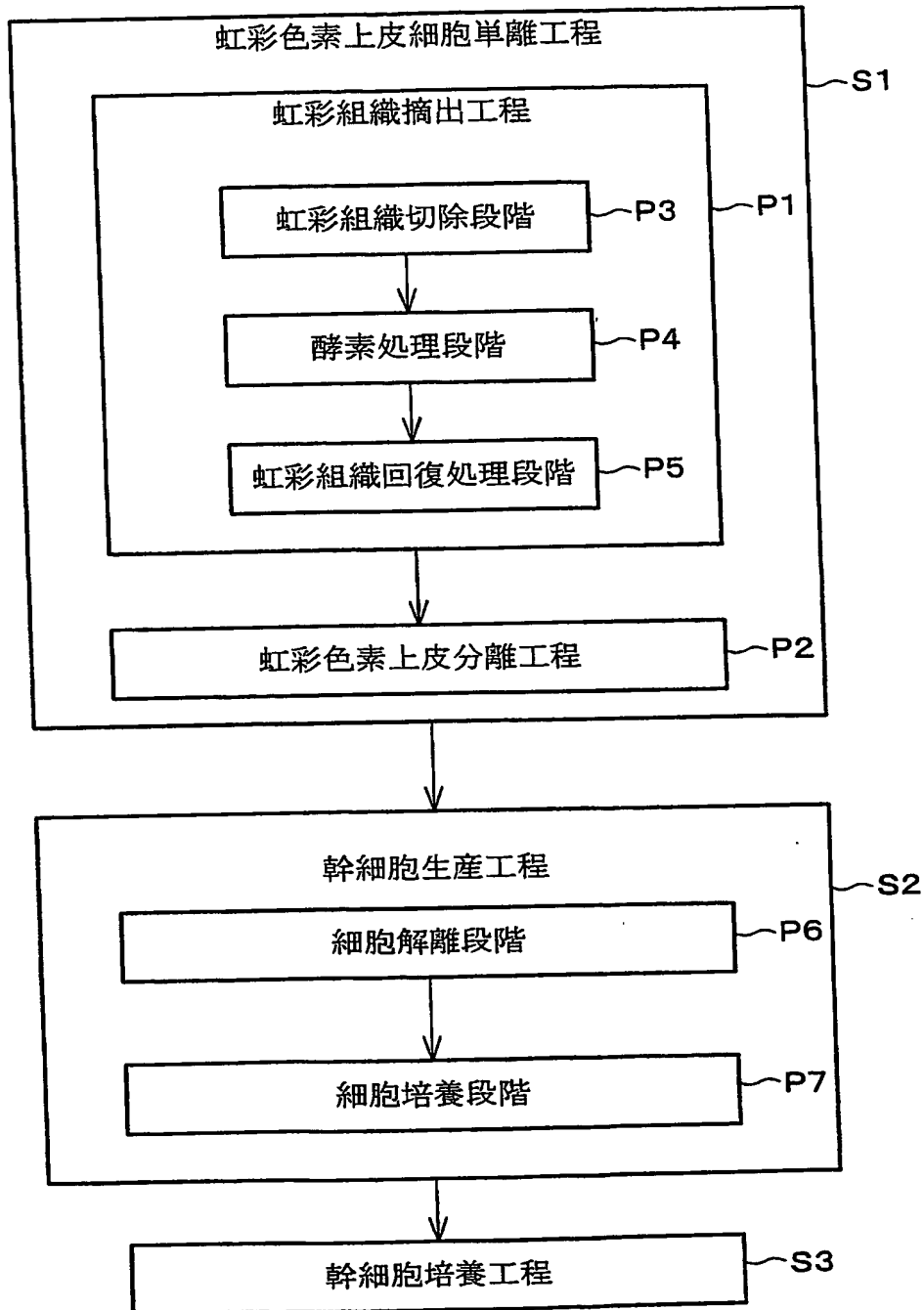
実施例 3 において、ラットから得た幹細胞を Oct-3/4 抗体による染色および DAPI 染色にて標識を行った結果を示す図である。

【図 6】

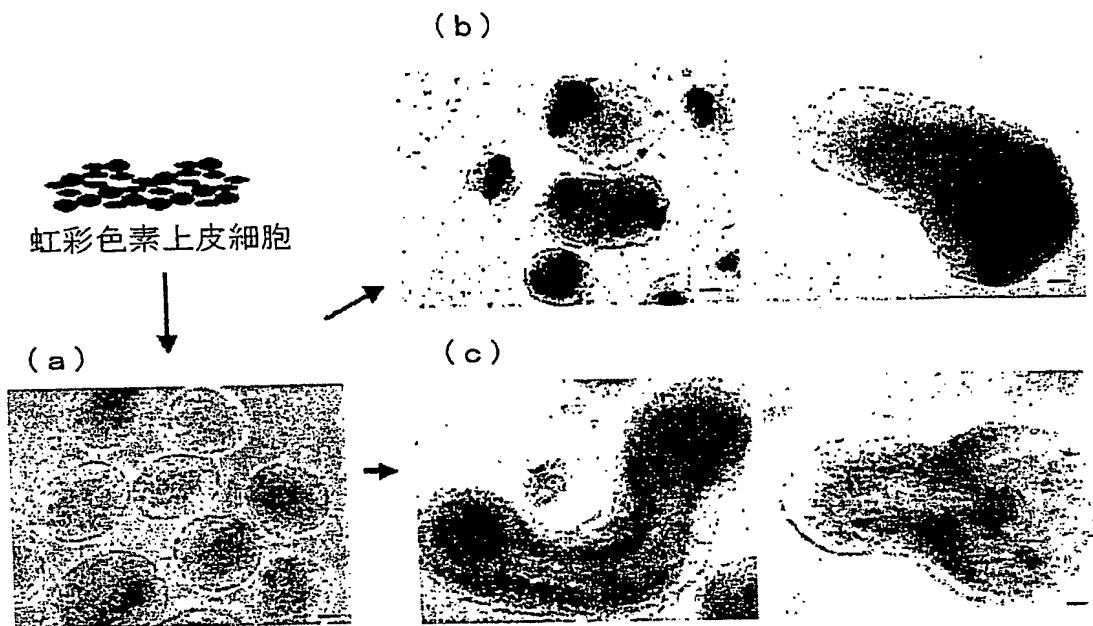
実施例 3 において、マウス眼球における Oct-3/4 遺伝子発現を示す図である。

【書類名】 図面

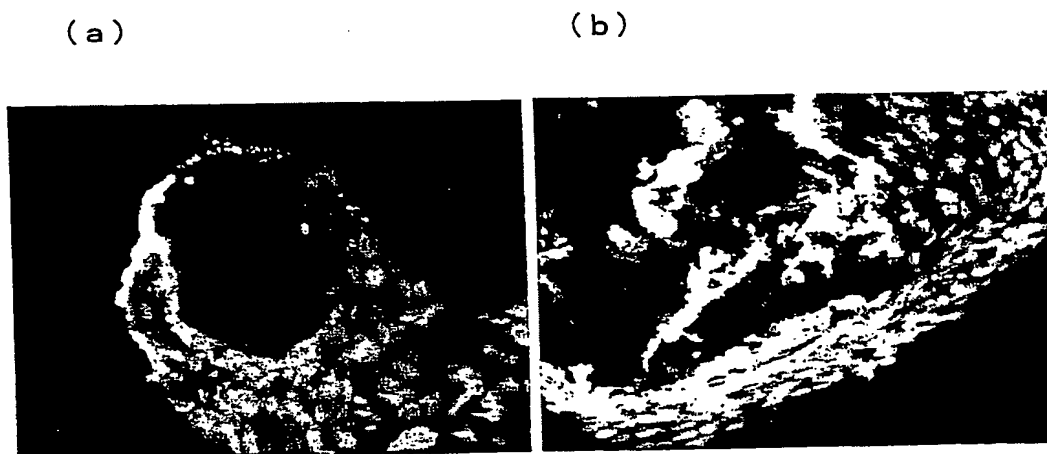
【図 1】



【図 2】

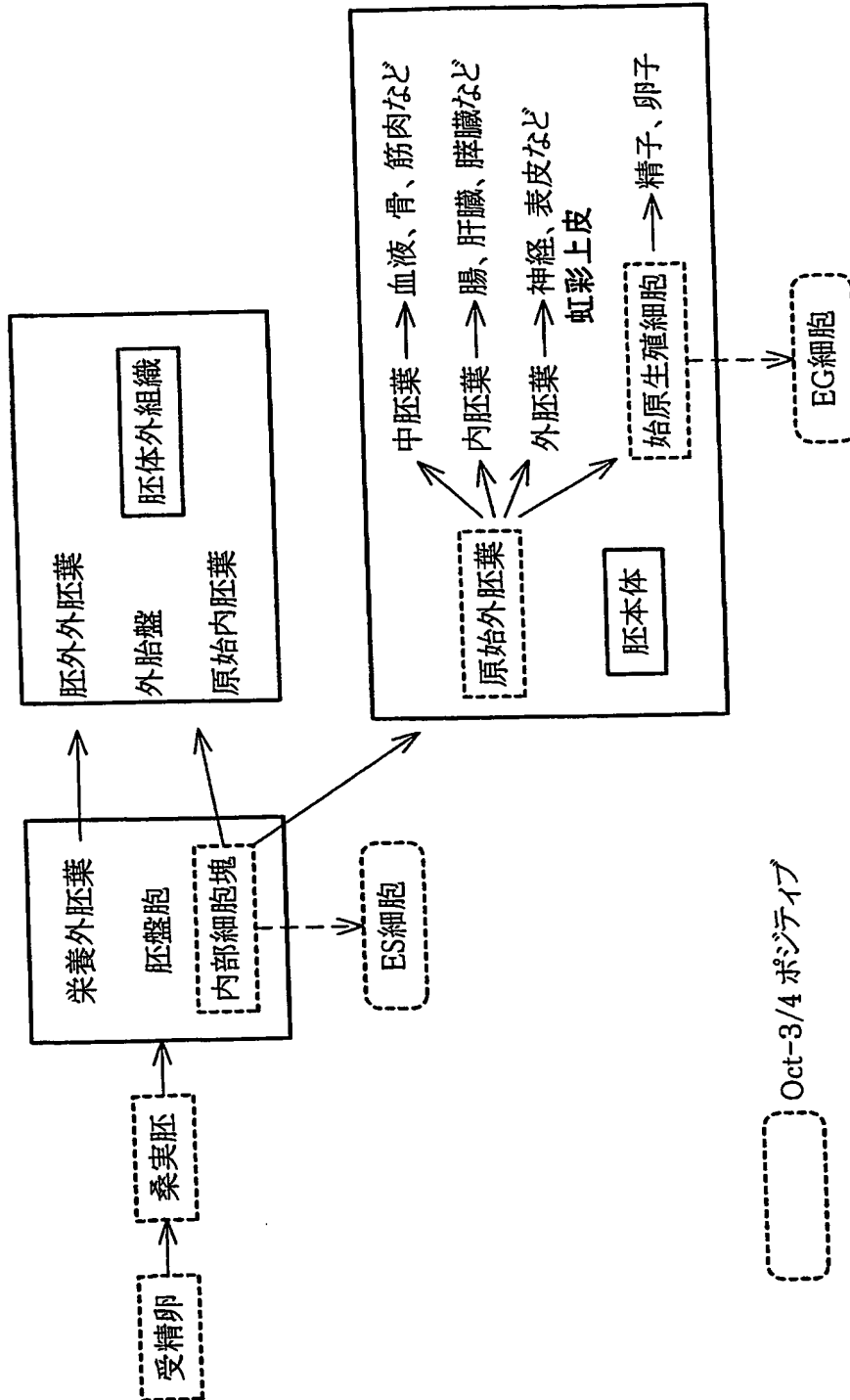


【図 3】





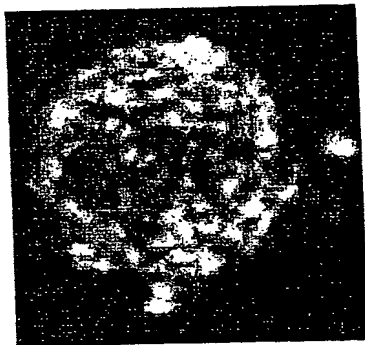
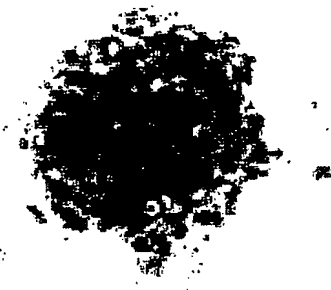
【図 4】



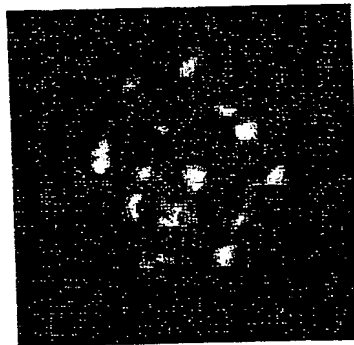
【図 5】

11日 ラット

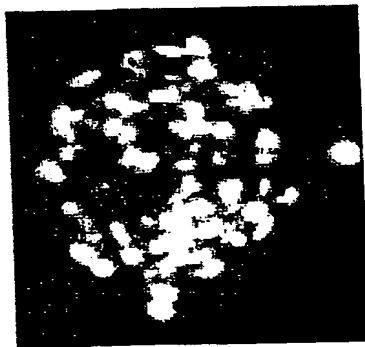
3週ラット



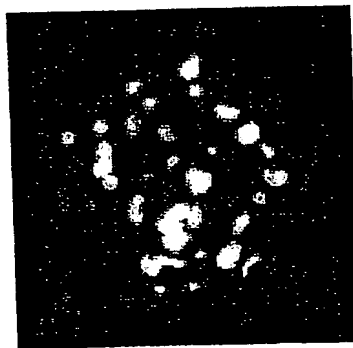
Oct-3/4



Oct-3/4

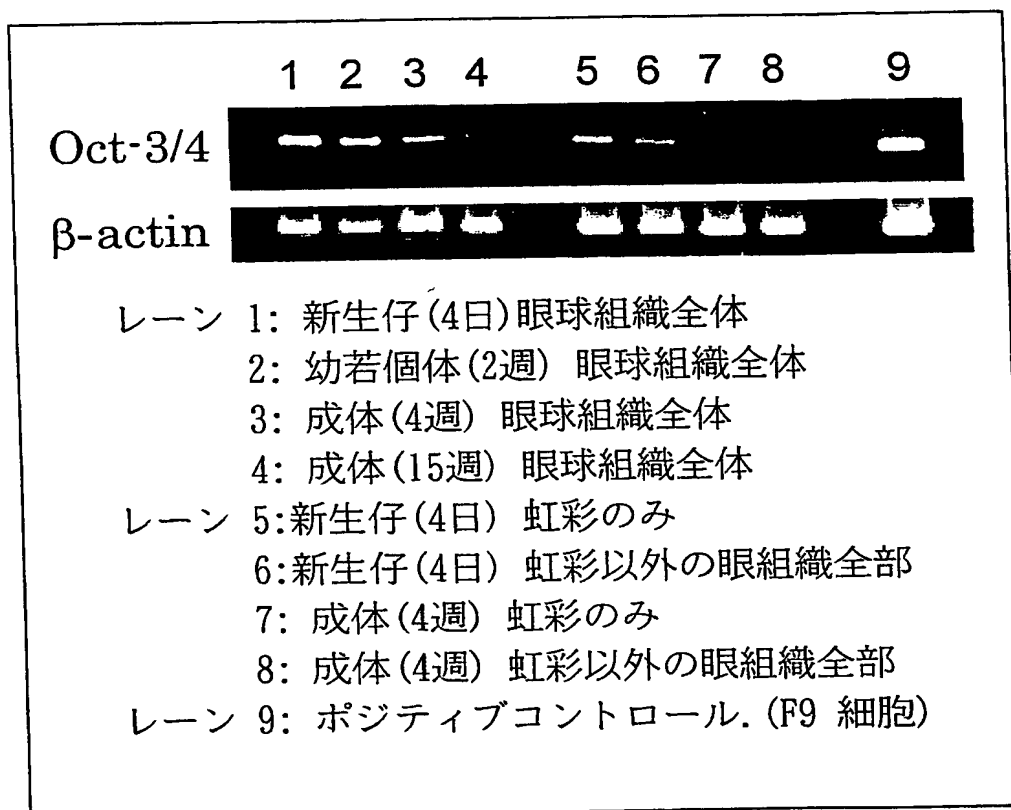


DAPI



DAPI

【図6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 細胞移植による免疫拒絶の問題、倫理的問題、移植細胞源の需要と供給のアンバランスなどの問題を解決し得る、動物の虹彩色素上皮細胞由来の組織細胞の生産方法、およびその方法により得られる組織細胞を提供する。

【解決手段】 組織細胞は、動物の眼球から単離した虹彩色素上皮細胞を浮遊凝集塊培養方法により選択的に培養することで得られる幹細胞を、さらに血清を用いて培養することにより生産される。

【選択図】 図 1

【書類名】 出願人名義変更届（一般承継）  
【提出日】 平成15年10月31日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【事件の表示】  
【出願番号】 特願2003-166684  
【承継人】  
【識別番号】 503360115  
【住所又は居所】 埼玉県川口市本町四丁目1番8号  
【氏名又は名称】 独立行政法人科学技術振興機構  
【代表者】 沖村 憲樹  
【連絡先】 〒102-8666 東京都千代田区四番町5-3 独立行政法人科学技術振興機構 知的財産戦略室 佐々木吉正 TEL 03-5214-8486 FAX 03-5214-8417

【提出物件の目録】  
【物件名】 権利の承継を証明する書面 1  
【援用の表示】 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。

【物件名】 登記簿謄本 1  
【援用の表示】 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。

特願 2003-166684

出願人履歴情報

識別番号

[396020800]

1. 変更年月日

1998年 2月24日

[変更理由]

名称変更

住所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏名

科学技術振興事業団

特願 2 0 0 3 - 1 6 6 6 8 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 5 0 3 3 6 0 1 1 5 ]

1. 変更年月日

2 0 0 3 年 1 0 月 1 日

[変更理由]

新規登録

住 所

埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号

氏 名

独立行政法人 科学技術振興機構

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**